

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/535 G01N 33/576



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02151727.4

[43] 公开日 2004 年 7 月 14 日

[11] 公开号 CN 1512178A

[22] 申请日 2002.12.27 [21] 申请号 02151727.4

[71] 申请人 杜凤鸣

地址 200433 上海市安波路 985 弄 4 号 402 室

[72] 发明人 杜凤鸣

[74] 专利代理机构 上海新天专利代理有限公司

代理人 王 巍

权利要求书 2 页 说明书 12 页

[54] 发明名称 定量法乙肝病毒前 S1 抗原酶联免疫测定试剂盒及制备方法

[57] 摘要

本发明属免疫诊断试剂。本发明公开了一种“定量法乙肝病毒前 S1 蛋白酶免测定试剂盒”。该试剂盒能定量检出完整 HBV，并且具有简便、灵敏和稳定等特点，操作简便快速，可以补充或替代常规的“两对半”和 PCR 检测法。本发明提供了制备方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种“定量法乙肝病毒 PreS1 抗原酶联免疫测定试剂盒”，其特征在于该试剂盒是由主要成份前 S1 抗原标准品 5 支、抗体预包被反应条 48-96 孔、酶标记前 S1 抗体和次要成份阳性对照液 1 支、阴性对照液 1 支、20 倍浓洗涤液 1 瓶、底物缓冲液甲 1 瓶、底物缓冲液乙 1 瓶及终止液（4N H₂SO₄）1 瓶组成。

2. 一种如权利要求 1 所述的一种“定量法乙肝病毒 PreS1 抗原酶联免疫测定试剂盒”的制备方法，其特征在于该方法包括下列步骤：

I. 抗体制备：

（1）制备抗原：HBV-DNA 重组 PreS1 Ag 基因片断的 21-47aa 及 1-199aa；

（2）制备抗体：

用上述重组抗原免疫豚鼠，得抗 PreS1 抗血清或免疫 Balb/C 小鼠得阳性鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合成杂交瘤细胞，筛选阳性克隆建株，得腹水；

抗血清或腹水用(NH₄)₂SO₄ 或正辛酸沉淀处理，得粗提抗 PreS1 抗体；

用 DE₅₂ 离子交换层析法得纯抗 PreS1 抗体；

经高压液相色谱(HPLC)检定，纯抗 PreS1 抗体呈单一峰，其纯度 95%以上。

（3）PreS1 Ag 标准品的制备：

收集乙肝患者阳性血清，过 Sepharos 4B 亲和层析柱，再过抗正常人 (IgG) Sepharos 4B 柱，测 HBV-DNA 含量。经钴 60r-线照射使 HBV-DNA 灭活。分装成 0、2、10、20、30ng/ml 共 5 支。

（4）HRP-抗前 S1 抗体制备：辣根过氧化物酶（HRP）与纯化的抗前 S1 抗体偶联；

（5）包被抗体成为予包被反应条：用抗 HBs 或抗 PreS1 豚抗；

（6）分装试剂盒其余 7 种成份，按试剂盒需要量分装在小瓶或

尖底离心管中；

(7) 检定试剂盒的特异性、灵敏度、精密度、稳定性合格；

(8) 组装成为成品。

3. 根据权利要求 1 所述的一种“定量法乙肝病毒 PreS1 抗原酶联免疫测定试剂盒”，其特征在于其中所述的前 S1 抗原标准品为灭活的 HBV-DNA、5 支、抗体预包被反应条为 48-96 孔、酶标记抗体、阳性对照液为 HBV-DNA 和 HBeAg 均阳性血清、酶标记的前 S1 抗体为辣根过氧化物酶、阴性对照液为正常人血清、浓洗涤液磷酸-Tween-20、底物缓冲液甲为 H_2O_2 、底物缓冲液乙为 3, 3' .5.5' — 四甲基联苯胺、终止液为 $4NH_2SO_4$ 。

定量法乙肝病毒前 S1 抗原酶联免疫测定试剂盒及制备方法

技术领域

本发明涉及免疫诊断试剂，具体涉及一种定量法乙肝病毒前 S1 (PreS1) 抗原(Ag)酶联免疫测定试剂盒及制备方法。

背景技术

长期以来，临床医生是根据“二对半”试剂盒检验结果判断乙肝患者的病情。但是“二对半”试剂查的是与乙型肝炎病毒(HBV)相关的表面和核内抗原和抗体，不是直接查 HBV。因此该方法不能确定患者有无 HBV。此外，用“二对半”试剂盒检查结果表明全世界约有 3 亿人为乙肝表面抗原(HbsAg)携带者，我国约有 1.3 亿，已成为世界之最，但实际上其中的部分人既无临床症状，转氨酶也不高，因此，并非所有 HbsAg 阳性者都携带 HBV。况且“二对半”仅能定性不能定量。

发明内容

本发明所要解决的技术问题在于克服上述不足之处，设计“定量法 HBV-PreS1 Ag (乙肝病毒-前 S1 抗原) 的酶免测定试剂盒”。

本发明提供了一种“定量法 HBV-PreS1 Ag 酶联免疫测定试剂盒”。该试剂盒是由主要成份为抗体预包被反应条、酶标记抗前 S1 抗体、PreS1 Ag 标准品及次要成份为阳性对照液 1 支、阴性对照液 1 支、20 倍浓洗涤液 1 瓶、底物缓冲液甲 1 瓶、底物缓冲液乙 1 瓶和终止液 1 瓶组成。

本发明的试剂盒中所述 PreS1 Ag 标准品为灭活的 HBV-DNA；抗体预包被反应条为 48-96 孔；阳性对照液为 HBV-DNA 和 HbeAg 均阳性血清；酶标记的 PreS1 抗体为辣根过氧化物酶；阴性对照液为正常人血清；底物缓冲液甲为 H_2O_2 ；底物缓冲液乙为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)和终止液为 $4NH_2SO_4$ 。

“定量法乙肝病毒 PreS1 Ag 酶免测定试剂盒”。因为已证明 PreS1 Ag 是 HBV-DNA 复制的必然标志物，若检测出病人 PreS1 Ag 阳性，说明其 HBV-DNA 存在。若进一步检测出病人 PreS1 Ag 的含量，就是 HBV-DNA 含量。

定量法 PreS1 Ag 酶免试剂盒的方法学研究

1. 实验方法

1.1. 定量 PreS1 Ag 检测：按“定量法 HBV-PreS1 Ag 酶联免疫测定试剂盒”说明书进行操作如下：

(1) 取出已包被条孔，插入支架上，用胶布固定，以防脱落。

(2) 反应孔中分别加各浓度标准品每孔加 0、2、10、20、30ng/ml、待检血清、阴性对照血清及阳性质控血清各 $50\mu l$ ，每次实验设空白 1 孔，加蒸馏 $50\mu l$ ，然后除空白孔外各孔加酶标记液 $50\mu l$ ，置 $37^\circ C$ 中反应 30 分钟。

(3) 甩去反应孔内液体在草纸上拍 2-3 下，然后用洗涤液洗 5 次，每次孔中加满洗涤液后停留 30 秒钟，甩去洗涤液后都要在草纸上拍干，以便洗涤彻底。（20 倍浓洗涤液 1ml+19ml 蒸馏水即为工作洗涤液）

(4) 各孔滴加底物缓冲液甲、乙各 1 滴， $37^\circ C$ 中反应 10 分钟后再各孔滴加终止液 1 滴，置酶标仪 450nm 波长读取各孔 A 值。

(5) 以标准品浓度为横座标，A 值为纵座标绘出标准曲线，以各待测血清 A 值在标准曲线上查出该血清的前 S1 抗原浓度。（详见定量法 HBV-PreS1 Ag 酶免试剂盒标准曲线）

1.2. 定量法测 PreS1 Ag 酶免试剂盒方法学鉴定

定量法 PreS1 Ag 酶免试剂盒与二步法 PreS1 Ag 酶免试剂盒检测的比较。

用中国药品生物制品检定所拟定的二步法 PreS1 Ag 酶免试剂盒，61 份标准参考品来检定二步法和“定量法 PreS1 Ag 酶免试剂盒”其检定结果完全一致，结果如下：

检验项目	标准规定	检验结果
阴性参考品符合率	不得出现假阳性 (0/27) (+/-)	0/27
阳性参考品符合率	允许出现 1 份假阴性 (1/30) (-/+)	1/30
精密性 CV (%)	≤15	15
灵敏度: 1#	≥1: 64	1: 512
2#	≥1:128	1:1024
3#	≥1: 32	1: 256
稳定性	37℃放 3 天后,检定指标达到要求	合格

说明“定量法测 PreS1 Ag 酶免试剂盒”的特异性、精密性、灵敏度和稳定性是良好的合格的。

1.3. 定量法 HBV-PreS1 Ag 酶免试剂盒的定量标准曲线的制定。

1.4. 正常人 HBV-PreS1 Ag 含量

选 369 例体检正常人(与献血员相当)血用“定量法 HBV-PreS1 Ag 酶免试剂盒”测定结果如下：

酶标板代码:2002102314161900

测量操作者:缺省

测量样本类型:血清

酶标仪测量类型(Single Wavelength)

酶标仪进板方式(连续)

测量主波长: 450 nm

酶标仪主波长测量 (空白参考值 0.000) :

0.082	0.086	0.084	0.087	0.079	0.083	0.077	0.081	0.076	0.076	0.081	0.077
0.081	0.087	0.076	0.075	0.081	0.077	0.086	0.085	0.078	0.086	0.081	0.090
0.091	0.080	0.076	0.079	0.083	0.087	0.082	0.078	0.076	0.093	0.087	0.088
0.094	0.074	0.073	0.088	0.084	0.089	0.087	0.074	0.075	0.083	0.076	0.089
0.080	0.085	0.083	0.075	0.078	0.080	0.091	0.083	0.080	0.120	0.079	0.078
0.092	0.079	0.079	0.078	0.078	0.091	0.078	0.084	0.077	0.078	0.075	0.086
0.095	0.087	0.104	0.077	0.076	0.079	0.075	0.075	0.104	0.086	0.078	0.092

0.084	0.079	0.085	0.085	0.080	0.088	0.087	0.081	0.088	0.091	0.079	0.095
0.082	0.075	0.072	0.085	0.085	0.082	0.076	0.082	0.080	0.096	0.079	0.079
0.074	0.072	0.072	0.075	0.078	0.074	0.072	0.078	0.073	0.071	0.071	0.077
0.082	0.080	0.076	0.077	0.078	0.078	0.077	0.073	0.072	0.077	0.082	0.081
0.082	0.074	0.071	0.072	0.071	0.076	0.075	0.074	0.083	0.072	0.069	0.087
0.081	0.075	0.071	0.079	0.074	0.077	0.074	0.066	0.086	0.106	0.090	0.073
0.076	0.076	0.074	0.077	0.077	0.071	0.076	0.073	0.078	0.073	0.076	0.075
0.086	0.081	0.079	0.075	0.075	0.077	0.078	0.078	0.079	0.080	0.080	0.079
0.084	0.080	0.076	0.075	0.067	0.077	0.078	0.082	0.082	0.083	0.072	0.084
0.076	0.079	0.079	0.071	0.077	0.074	0.077	0.075	0.076	0.076	0.076	0.073
0.073	0.076	0.068	0.070	0.073	0.075	0.076	0.082	0.070	0.075	0.075	0.075
0.090	0.089	0.073	0.081	0.080	0.076	0.072	0.082	0.097	0.080	0.074	0.081
0.076	0.076	0.070	0.076	0.072	0.073	0.073	0.074	0.071	0.072	0.074	0.076
0.071	0.075	0.076	0.073	0.091	0.075	0.079	0.082	0.072	0.078	0.083	0.078
0.081	0.081	0.074	0.082	0.078	0.077	0.075	0.072	0.073	0.074	0.079	0.082
0.088	0.086	0.078	0.073	0.079	0.078	0.083	0.094	0.076	0.071	0.082	0.075
0.088	0.071	0.079	0.074	0.083	0.082	0.071	0.085	0.085	0.071	0.079	0.078
0.072	0.071	0.071	0.077	0.078	0.080	0.073	0.075	0.082	0.088	0.077	0.072
0.076	1.152	0.067	0.069	0.071	0.082	0.081	0.076	0.075	0.074	0.071	0.071
0.065	0.073	0.070	0.071	0.077	0.077	0.070	0.071	0.073	0.071	0.071	0.066
0.206	0.073	0.297	0.076	0.077	0.077	0.092	0.073	0.150	0.079	0.131	0.143
0.080	0.093	0.122	0.085	0.068	0.069	0.083	0.072	0.074	0.122	0.158	0.114
0.067	0.082	0.072	0.071	0.073	0.074	0.075	0.074	0.130	0.071	0.137	0.112
0.066	0.068	0.071	0.086	0.074	0.068	0.072	0.073	0.077			

上述体检的正常人(与献血员相当)血 369 例的 A_{450} 值的均值 $\bar{X}=0.083694$ 标准偏差 $SD=0.058291$

因此其 cut off 值(临界值)为均值 $X+3SD=0.258=2.5ng/ml$ 血

即 A_{450} 值大于 0.258(2.5ng/ml 血)为阳性。

而灰区范围: 正常人 A_{450} 值 $\bar{X}——\bar{X}+3SD$ 为 0.0836-0.258, 遇到灰区范围的 A_{450} 值要复查。

定量 HBV-PreS1 Ag 酶免试剂盒的临床应用和与定量 PCR 荧光试剂盒比较

2000 年 8 月至 2002 年 2 月第二军医大学附属长海医院、上海

第二医科大学附属新华医院和上海市传染病医院使用我们研制建成的“定量法 HBV-PreS1 Ag 酶免试剂盒”和“HBV 的 PCR 荧光定量法检测试剂盒”同时检测乙肝患者阳性血清 146 份，以比较两种定量之间的相关性。

1. 临床血清标本的来源：

各医院临床收集乙肝患者血清标本总数为 146 份，其中长海医院 66 份、新华医院 36 份、传染病医院 44 份，共 146 份。

另外，从长海医院收集到体检正常（与献血员相当）血 369 份（做正常值用）

2. 使用定量法 HBV-PreS1 酶免法与 HBV-PCR 荧光定量法比较

2.1. 方法

三个医院分别使用“定量法 HBV-PreS1 Ag 酶免试剂盒”（按其说明书操作）和 PCR 荧光定量法试剂盒（按 HBV-PCR 荧光检测试剂盒说明书操作—深圳匹基生物技术开发有限公司）检测同一血样 146 份，并经统计学处理结果表明，该两种方法检测的结果非常显著的相关，以表 1 和图 1-3 显示如下：

2.2. 结果

三个医院分别使用“定量法 PreS1 Ag 酶免试剂盒”和 PCR 荧光定量法试剂盒检测同一血样 146 份结果。

表 1 三个医院两种方法比较

医院	血样数	相关系数 (r)	P 值	备注
长海	66	0.659	0.000	非常显著相关
新华	36	0.508	0.001	非常显著相关
传染	44	0.407	0.002	非常显著相关

上海三个医院使用“定量法 HBV-PreS1 Ag 酶免试剂盒”与“HBV-PCR 荧光定量试剂盒”测定同一血样的比较结果，两种方法均非常显著相关，均 P 值 < 0.01。说明两种方法具有同等的使用价

值，“定量法 HBV-PreS1 Ag 酶免试剂盒”与“HBV-PCR 荧光定量试剂盒”相媲美。

讨论

PreS1 蛋白是 HBVS 区基因编码产物，它和 PreS2 蛋白一起在 HBV 附着和侵入肝细胞的机制中起重要作用。PreS1 蛋白主要存在于 Dane 颗粒中。已证实 HBV 的 PreS1 蛋白的 P21-47 肽是吸附于靶细胞受体的配体。

目前，通过血清学检查以判断 HBV 感染状态的常用手段是检测 HBV-M，即所谓“两对半”：HbsAg-HbsAb，HbeAg-HbeAb 和 HbcAb，其中 HbeAg 和 HbcAb 阳性，表明 HBV 在肝内复制。然而，常规 HBV-M 检测方法繁琐、耗时，且结果分析比较复杂。PCR 法定量测定 HBV-DNA（PCR 定量法）亦已在一些大医院开展，但是尽管该方法有敏感性高等特点，亦因其操作步骤繁琐、费时、技术要求高、消耗性试剂昂贵收费价又高，很难被普遍应用。Theilman 等首先报告用 western blot 技术检测了 HbsAg 阳性病人血清 PreS1 蛋白，认为该蛋白与 HbeAg 和 HBV-DNA 有良好的相关性，是 HBV 在体内复制的标志。我们用重组 PreS1 Ag 免疫豚鼠制备多体或免疫 Balb/c 小鼠得抗 PreS1 单抗，经过 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粗提，再柱层析 (DE_{52})，获高效价多体或单抗。用 Sepharos 4B 亲和层析柱纯化乙肝患者血清中的 HBV-DNA，再用抗正常人 (IgG) Sepharos 4B 柱得进一步纯化的 HBV-DNA 做标准品。在国内首先建成了“定量法乙肝病毒 PreS1 Ag 酶免试剂盒”。经方法学鉴定证明“定量法乙肝病毒 PreS1 Ag 酶免试剂盒”的特异性、精密性、灵敏度和稳定性合格，定量是准确的。经过临床应用结果表明，定量法 HBV-PreS1 Ag 检测试剂盒在下述两个方面具有重要价值。

首先，“定量法乙肝病毒 PreS1 Ag 酶免试剂盒”不仅能查出 HBV 的感染(或载毒)，而且还能查到感染者 HBV 的含量，可与“HBV-PCR 荧光测定试剂盒”相媲美。这对乙肝患者的防治，特别疗效的判定指

标明确，治疗能使 HBV 减多少可判定之。

另外，“定量法乙肝病毒 PreS1 Ag 酶免试剂盒”也具有操作简便、快速和经济的特点，40 分钟出报告，广大临床检验工作者省时、省费用，而乙肝患者省费用，所以很受欢迎。

本发明的另一所要解决的问题是提供了“定量法（立可读）PreS1 Ag 酶免测定试剂盒”的制备方法。该方法包括下列步骤：

1. 抗体制备：

1.1. 制备抗原：HBV-DNA 重组 PreS1 Ag 基因片断的 21-47aa 及 1-199aa；

1.2. 制备抗体：

1.2.1. 用上述重组抗原免疫豚鼠，得抗 PreS1 抗血清或免疫 Balb/C 小鼠得阳性鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合成杂交瘤细胞，筛选阳性克隆建株，得腹水；

1.2.2. 抗血清或腹水用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 或正辛酸沉淀处理，得粗提抗 PreS1 抗体；

1.2.3. 用 DE_{52} 离子交换层析法得纯抗 PreS1 抗体；

1.2.4. 经高压液相色谱(HPLC)检定，纯抗 PreS1 抗体呈单一峰，其纯度 95%以上。

2. HRP-抗前 S1 抗体制备：辣根过氧化物酶（HRP）与纯化的抗前 S1 抗体偶联；

3. 前 S1 Ag 标准品的制备：收集乙肝患者阳性血清，过 Sepharos 4B 亲和层析柱，再过抗常人（IgG）Sepharos 4B 柱后，测 HBV-DNA 含量。经钴 60r-线照射使 HBV-DNA 灭活。分装成 0、2、10、20、30、40ng/ml 共 5 支。

4. 包被抗体成为予包被反应条：用抗 HBS 或抗 PreS1 豚抗；

5. 分装试剂盒其余 7 种成份，按试剂盒需要量分装在小瓶或尖底离心管中；

6. 检定试剂盒的特异性、灵敏度、精密度、稳定性合格；

7. 组装成为成品。

本发明的试剂盒在使用时可以如下操作：

1. 取出已包被条孔，插入支架上，用胶布固定，以防脱落。

2. 反应孔中，分别加各浓度标准品。待检血清 50 μ l，各板设阳性对照 1 孔（50 μ l）阴性对照 1 孔（50 μ l），空白对照 1 孔（加蒸馏水 50 μ l），然后除空白对照孔外各孔加酶标记液 50 μ l，置 37 $^{\circ}$ C 中反应 30 分钟。

3. 取出反应板甩去孔内液体后停留 30 秒钟，每次甩去洗涤液后都要在草纸上拍干，以便洗涤彻底。（20 倍浓洗涤液 1ml+19ml 蒸馏水即为工作洗涤液）

4. 各孔滴加底物缓冲液甲、乙各 1 滴，室温避光 10-15 分钟后每孔滴加终止液 1 滴，置酶标仪中 450nm 波长读数。

5. 结果判定

以标准品浓度为横座标，以待检血清 A 值为纵座标绘出标准曲线，从各待检血清 A 值就可在标准曲线上查出该血清的 PreS1 Ag 浓度。

本发明的试剂盒能非常专一地定量测出检测患者血清中 HBV-PreS1 蛋白的含量。它具有简便、灵敏和稳定等特点。且本试剂盒操作简便快速，采用一步法可在 40 分钟左右获得实验结果，比 PCR 检测法省时（PCR 法最快需 6-8 小时完成实验），经临床试用 PreS1 蛋白定量法与 PCR 定量的 HBV-DNA 有很好的符合率，因而本试剂盒对判断病人是否有病毒复制和定量，确定乙肝感染病程预后及用药后的疗效具有十分重要的参考意义。本试剂盒与 PCR 法相比，PCR 法需贵重的仪器设备，消耗性试剂昂贵，收费价又高，而本试剂盒整个实验中无需贵重仪器设备，消耗性试剂便宜且收费价低廉，能适用于各级医院及临床测试中心，也可用于流行病学普查。定量法 PreS1 Ag 试剂盒，具有简便、灵敏、重复性好的优点，能检出病人完整 HBV 含量，将可被普遍使用，做为 HBV 感染，复制和乙肝病人诊断、治疗和预后的一个新的标志，与其抗 PreS1 抗体联合可成为新的乙肝检测系统。

具体实施方式

实施例1 制备定量法乙肝病毒前 S1 蛋白酶免试剂盒的生产步骤

(一) 纯化包被抗体 (HbsAb):

HbsAg 免疫豚鼠得单抗或用重组 PreS1 Ag 免疫豚鼠得抗 PreS1 多抗。加等体积的饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, 粗提后再经 DE-52 柱纯化, 收集蛋白峰, PBS 透析得抗 HBs 或抗 PreS1 多抗纯品。经 HPLC 检定得纯抗 PreS1 抗体, 呈现单一峰。纯度 >95%, 效价 >10 万。

(二) 酶标记抗体制备

1. 抗体制备: 基因重组的 PreS1 Ag (21-47aa) 及 (1-119aa) 免疫豚鼠得抗 PreS1 抗体或重组 PreS1 Ag 免疫 Balb/c 小鼠得腹水。用饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀粗提两次, 再经 DE-52 柱纯化, 得纯抗 PreS1 抗体或单克隆抗体。效价 >10 万, 经 HPLC 鉴定纯度在 95% 以上。

2. 酶标记抗体制备

抗 PreS1 抗体用过碘酸钠法与辣根过氧化物偶联对 PBS 充分透析, 加等体积甘油, -20°C 以下保存。效价 >2000。

3. 前 S1 Ag 标准品的制备:

收集乙肝患者阳性血清, 过 Sepharos 4B 亲和层析柱, 再过抗正常人(IgG)Sepharos 4B 柱, 测 HBV-DNA 含量。经钴 60r -线照射使 HBV-DNA 灭活。分装成 0、2、10、20、30ng/ml 共 5 支。

4. 酶标记抗体浓度选定

采用方阵滴定法选择酶标记抗体的工作浓度大于 1: 2000。PreS1 重组抗原从 $10\ \mu\text{g/ml}$ 倍增稀释, 包被酶标板, 加梯度稀释的酶标抗体测定, 以确定最适稀释度。

(三) 预包装抗体板的制备

1. 包被

Na_2CO_3	0.6g
NaHCO_3	1.58g

重蒸水 500ml

加入适量 Anti-S 抗体，调整 PH 至 9.5，加入微孔板各孔中，置湿盒中加盖，4℃过夜甩干。

2. 洗涤

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.6g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.4g
20%Tween—20	2.5ml
NaCL	8.2g
重蒸水	100ml

调整 PH 至 7.2，1:10 稀释后，加入微孔板各孔中，静置 5 秒后甩干，上述操作重复三次，以除去剩余抗体。

3. 封闭

明胶	1.1g	微波炉加温	注入酶标
BSA	5.0g	至呈透明溶液	板各孔中
0.1N PBS 20ml	——→	冷却至室温	——→
蒸馏水至 100ml			

弃去液体

放入湿盒中（加盖） 吸水纸上拍干 重复一次，待干燥后，
——→ 37℃ 1hr ——→ 放入有干燥剂的塑料袋
封口，保存于 4℃。

（四）阳性对照的制备

HBeAg 和 HBV-DNA 同时呈阳性的乙肝患者血清，60℃放置 1 个小时，除菌过滤，用本药盒测定 A 值>0.3，备用，分装。

（五）阴性对照的制备

用本试剂盒测定正常人血清 A 值在 0-0.03，加万分之二硫柳汞，分装备用。

（六）酶标单抗配置

—————→
10%小牛血清
90%0.15MPBS

Anti—preS1—HRP $\xrightarrow{\hspace{10em}}$ 稀释 20 倍, 分装。
 (稀释度 1:2000)

(七) 酶标单抗稀释液

BSA	0.5g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.6g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.4g
NaCL	8.2g
20%Tween—20	100ml

调整 PH 至 7.2

(八) 底物液 A

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1.7g
柠檬酸·H ₂ O	0.5g
3%H ₂ O ₂	200μl
重蒸水	100ml

调整 PH 至 5.0

(九) 底物液 B

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1.7g
柠檬酸·H ₂ O	0.5g
重蒸水	100ml

调整 PH 至 5.0 后, 加入 10ml DMSO 含 60mg TMB 的溶液 25μl

(十) 终止液

浓 H ₂ SO ₄	10ml
重蒸水	80ml

(十一) 10x 洗涤液

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.6g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.4g
20%Tween—20	2.5ml
重蒸水	100ml

调整 PH 至 7.2

(十二) 半成品及成品的组成

上述（一）→（十一）步骤所得产品装入小瓶及尖底离心管中，即为半成品。抽出三份经过特异性、稳定性、灵敏度及精密度检定合格才能组装成 preS1 试剂盒。组装成盒后还需抽出三份同半成品一样经过检定合格才能出售。

专利名称(译)	定量法乙肝病毒前S1抗原酶联免疫测定试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN1512178A	公开(公告)日	2004-07-14
申请号	CN02151727.4	申请日	2002-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	杜凤鸣		
申请(专利权)人(译)	杜凤鸣		
当前申请(专利权)人(译)	杜凤鸣		
[标]发明人	杜凤鸣		
发明人	杜凤鸣		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/576		
代理人(译)	王巍		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属免疫诊断试剂。本发明公开了一种“定量法乙肝病毒前S1蛋白酶免测定试剂盒”。该试剂盒能定量检出完整HBV，并且具有简便、灵敏和稳定等特点，操作简便快速，可以补充或替代常规的“两对半”和PCR检测法。本发明提供了制备方法。